



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 14/505, A61K 38/18		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/35718
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. November 1996 (14.11.96)	
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/01988 (22) Internationales Anmeldedatum: 10. Mai 1996 (10.05.96) (30) Prioritätsdaten: 95107165.3 11. Mai 1995 (11.05.95) EP (34) Länder für die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist: 195 22 461.2 21. Juni 1995 (21.06.95) DE usw. DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BURG, Josef [DE/DE]; An der Bärenmühle 1, D-82362 Weilheim (DE). SCHNEIDER, Walter [DE/DE]; Geistbühlstrasse 27, D-82362 Weilheim (DE). WRBA, Alexander [DE/DE]; Auf der Etz 21 A, D-82377 Penzberg (DE). FÜRST, Werner [DE/DE]; Hochfeldstrasse 44, D-82377 Penzberg (DE). SELLINGER, Karl-Heinz [DE/DE]; Trifhofstrasse 15, D-82362 Weilheim (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING ERYTHROPOIETIN CONTAINING NO ANIMAL PROTEINS			
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON ERYTHROPOIETIN FREI VON TIERISCHEN PROTEINEN			
(57) Abstract			
<p>A preparation of a protein with erythropoietin activity and obtainable after culturing an erythropoietin-producing host cell is characterised by a) a host-cell proteins content of ≤ 100 ppm, b) a host cell DNA content of ≤ 10 pg per $83 \mu\text{g}$ of erythropoietin, and c) a total absence of mammalian proteins not derived from the host cell. The preparation is obtained following serum-free culture using a purification process involving dye chromatography, hydrophobic chromatography on an alkylated or arylated carrier, chromatography on hydroxyapatite, hydrophobic chromatography and anion exchange chromatography.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Präparat eines Proteins mit Erythropoietinaktivität, erhältlich nach Kultivierung einer Wirtszelle, welche Erythropoietin produziert, gekennzeichnet durch a) einen Gehalt von Proteinen, die aus der Wirtszelle stammen, von ≤ 100 ppm, b) einen Gehalt von DNA aus der Wirtszelle von ≤ 10 pg/$83 \mu\text{g}$ Erythropoietin und dadurch, daß c) das Präparat vollständig frei von Säugerproteinen ist, die nicht aus der Wirtszelle stammen, wird nach serumfreier Kultur durch ein Aufreinigungsverfahren aus Farbstoffchromatographie, hydrophobe Chromatographie an einem alkylierten oder arylierten Träger, Chromatographie an Hydroxyapatit, hydrophobe Chromatographie und Anionenaustauscherchromatographie erhalten.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauritanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Verfahren zur Herstellung von Erythropoietin frei von tierischen Proteinen

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Erythropoietin, welches frei von tierischen Fremdproteinen, mit Ausnahme von Proteinen der Wirtszelle, ist.

Erythropoietin(EPO) ist ein humanes Glycoprotein, welches die Bildung von Erythrozyten stimuliert. Seine Wirkung und therapeutische Anwendung ist beispielsweise in EP-B 0 148 605, Huang, S.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 2708-2712, EP-B 0 205 564, EP-B 0 209 539 und EP-B 0 411 678 sowie Lai, P.H., et al., J. Biol. Chem. 261 (1986) 3116-3121 und Sasaki, H., et al., J. Biol. Chem. 262 (1987) 12059-12076 ausführlich beschrieben. Therapeutisch verwendetes Erythropoietin wird rekombinant hergestellt (EP-B 0 148 605 und EP-B 0 209 539).

Die rekombinante Herstellung von Erythropoietin erfolgt üblicherweise in CHO-Zellen, unter Zusatz von fötalem Kälberserum und gegebenenfalls Rinderinsulin im Kulturmedium. Damit enthält eine so hergestellte EPO-Präparation auch nach der Reinigung zumindest Spuren von Substanzen, die aus diesen Zusätzen stammen. Dies können beispielsweise bovine Viren und vergleichbare Agentien, Restmengen an bovinen Proteinen und/oder boviner DNA sein.

Es ist bekannt, eine serumfreie Fermentation von rekombinanten CHO-Zellen, welche ein EPO-Gen enthalten, mit den Methoden des Standes der Technik durchzuführen. Derartige Verfahren sind beispielsweise beschrieben in der EP-A 0 513 738, EP-A 0 267 678 und in allgemeiner Form von Kawamoto, T., et al., Analytical Biochem. 130 (1983) 445-453, EP-A 0 248 656, Kowar, J. und Franek, F., Methods in Enzymology 421 (1986) 277-292, Bavister, B., Expcology 271 (1981) 45-51, EP-A 0 481 791, EP-A 0 307 247, EP-A 0 343 635, WO 88/00967. Es hat sich gezeigt, daß bei serumfreier Kultur von EPO produzierenden eukaryontischen Wirtszellen der Anteil von Proteinen der Wirtszelle an der Gesamtproteinmenge mehr als doppelt so groß ist wie bei Kultur in serumhaltigen Medien. Ebenso enthält eine solche Protein-Präparation Nukleinsäuren aus den Wirtszellen in nicht vernachlässigbarer Menge.

In der EP-A 0 267 678 wird zur Aufreinigung des in serumfreier Kultur hergestellten EPO nach Dialyse eine Ionentauscherchromatographie an S-Sepharose, eine präparative Reverse Phase-HPLC an einer C₈-Säule und eine Gelfiltrationschromatographie beschrieben. Dabei kann der Gelfiltrationschromatographieschritt durch eine Ionentauscherchromatographie an S-Sepharose fast flow ersetzt werden. Ebenso wird vorgeschlagen, vor der Ionenaustauscherchromatographie eine Farbstoffchromatographie an einer Blue Trisacryl-Säule durchzuführen.

Auf solche Weise gereinigtes EPO hat eine Reinheit von etwa 99 % und enthält jedoch damit immer noch erhebliche Mengen an Protein und DNA aus der Wirtszelle.

In der EP-A 0 513 738 ist ein Verfahren zur Herstellung von EPO in Säugerzellen beschrieben, ohne daß näher auf die Aufreinigung eingegangen wird.

Von Nobuo, I., et al., J. Biochem. 107 (1990) 352-359 ist ein Verfahren zur Reinigung von rekombinantem EPO beschrieben. Bei diesem Verfahren wird EPO jedoch vor den Reinigungsschritten mit einer Lösung von Tween® 20, Phenylmethylsulfonylfluorid, Ethylmaleinimid, Pepstatin A, Kupfersulfat und Oxamsäure behandelt. Diese Zusätze, auch wenn sie im pharmazeutischen Präparat nur noch in Spuren vorhanden sind, sind aus therapeutischer Sicht bedenklich.

Für eine therapeutische Anwendung ist es außerdem bevorzugt, wenn ein therapeutisch wirksames Präparat vollständig frei von Proteinen und Nukleinsäuren aus Säugerzellen und weitgehend frei von Proteinen und Nukleinsäuren aus der Wirtszelle ist.

Gegenstand der Erfindung ist ein therapeutisch wirksames Präparat eines Proteins mit Erythropoietinaktivität, erhältlich nach Kultivierung einer Wirtszelle, welche Erythropoietin produziert, gekennzeichnet durch:

- a) einen Gehalt von Proteinen, die aus der Wirtszelle stammen, von höchstens 100 ppm (w/w), vorzugsweise 40 ppm oder weniger, und besonders bevorzugt 20 ppm oder weniger,
- b) einen Gehalt von DNA aus der Wirtszelle von höchstens 10 pg pro 83 µg EPO, vorzugsweise 1 pg pro 83 µg EPO oder weniger, und dadurch, daß
- c) das Präparat vollständig frei von natürlichen Säugerproteinen ist, die nicht aus der Wirtszelle stammen.

Eine derartige EPO-Präparation, die zudem frei ist von Phenylmethylsulfonylfluorid, Pepstatin A und/oder Cu-Ionen, ist bisher nicht bekannt und auch durch die Methoden des Standes der Technik, insbesondere in therapeutisch wirksamen Mengen, nicht herstellbar. Um eine homogene EPO-Präparation dieser Spezifikation, vorzugsweise in hoher Ausbeute, zu erhalten und zu isolieren, ist die Kombination der Verfahrensschritte gemäß der Erfindung erforderlich.

Unter einem Protein mit Erythropoietinaktivität wird ein Protein verstanden, welches die biologische Funktion von EPO besitzt. Diese biologische Funktion besteht darin, in erythroiden Vorläuferzellen Differenzierungs- und Teilungsvorgänge zu stimulieren und dadurch Erythrozyten bereitzustellen. Vorzugsweise ist dieses Protein in seinen Eigenschaften identisch oder im wesentlichen identisch mit humanem Erythropoietin und besteht aus 166 Aminosäuren, bei einem Molekulargewicht von ca. 34 - 38 kD, wobei der Anteil der Glycosylreste im Molekulargewicht ca. 40 % beträgt. Derivate und Fragmente von EPO, welche eine analoge Aktivität haben und nach Kultivierung einer EPO produzierenden Wirtszelle hergestellt werden, können ebenfalls nach den erfindungsgemäßen Verfahren in reiner Form hergestellt werden. Die DNA- und Proteinsequenz von humanem EPO ist beispielsweise in der EP-B 0 205 564 und EP-B 0 209 539 beschrieben.

Unter "vollständig frei von natürlichen Säugerproteinen" ist zu verstehen, daß im Präparat dadurch, daß bei der Kultur der Wirtszelle keine Fremdproteine aus natürlichen Quellen, wie Rinderserumalbumin oder fötales Kälberserum, zugesetzt werden, auch keine derartigen Fremdproteine in nachweisbarem Umfang enthalten sind. Das Präparat ist also völlig frei von planmäßig zugesetzten derartigen Säugerproteinen, die nicht aus der Wirtszelle stammen und sonst üblicherweise bei einer serumfreien Kultur dem Kulturmedium zur Aufrechterhaltung und Verbesserung des Zellwachstums sowie zur Optimierung der Ausbeute zugesetzt werden. Unter natürlichen Säugerproteinen werden Säugerproteine aus natürlichen Quellen, wie aus Humanmaterial oder aus tierischem Material, verstanden, nicht jedoch rekombinante Säugerproteine, die beispielsweise in Prokaryonten, wie E.coli, hergestellt wurden.

Derartige, bei der Zellkultivierung zugesetzten Säugerproteine sind beispielsweise Rinderserumalbumin, fötales Kälberserum, Transferrin (human oder Rind), Insulin (Schwein oder Rind) oder Gelatine.

Unter einer "Wirtszelle" ist eine tierische oder humane Zelle zu verstehen, deren Genom ein aktives EPO-Gen enthält, wobei dieses EPO-Gen bei Kultur der Zelle in einem serumfreien

Medium transkribiert und translatiert wird. Das EPO-Gen kann in diese Wirtszelle als exogenes Gen, vorzugsweise mit Regulationselementen, eingebracht werden (vgl. z. B. EP-B 0 148 605, EP-B 0 209 539), als aktives endogenes Gen in der Wirtszelle bereits vorhanden sein oder als endogenes nicht-aktives Gen aktiviert worden sein. Eine solche Aktivierung von endogenen Genen kann beispielsweise durch gezielte Einbringung von Regulationselementen in das Genom, beispielsweise durch homologe Rekombination, erfolgen. Derartige Verfahren sind bekannt und beispielsweise in der WO 91/09955 beschrieben.

Als Wirtszellen werden üblicherweise Säugerzellen verwendet. Falls ein exogenes humanes EPO-Gen eingebracht wird, können beispielsweise als Wirtszellen CHO- oder BHK-Zellen verwendet werden. Falls zur Expression ein endogenes EPO-Gen verwendet wird, werden zweckmäßig humane Zellen, wie beispielsweise humane Nieren-, Leber- oder Lymphzellen verwendet.

Unter "Proteine, die aus der Wirtszelle stammen" sind Proteine zu verstehen, die bei der Kultivierung der das aktive EPO-Gen enthaltenden Wirtszellen entstehen und nicht die oben angeführte Spezifikation von EPO besitzen. Die Angabe des Proteinsgehalts erfolgt in ppm, bezogen auf Gewicht (w/w). Der Gehalt dieser Proteine kann beispielsweise bestimmt werden durch einen ELISA, der auf polyklonalen Antikörpern basiert, die gegen die Proteine der Wirtszelle gerichtet sind. Derartige polyklonale Antikörper werden erhalten, indem Tiere, vorzugsweise Schafe, immunisiert werden mit einem Extrakt der Proteine der Wirtszelle (extrazelluläre und intrazelluläre Proteine). Der Test erfolgt vorzugsweise als Sandwichtest mit einem immobilisierten polyklonalen Antikörper und einem Peroxidase-markierten zweiten Antikörper. Als Standard wird der Gesamtproteinextrakt verwendet. Die untere Nachweisgrenze eines solchen Tests liegt bei etwa 15 ng Protein pro ml. Dies entspricht bei einer üblichen EPO-Konzentration von etwa 3,0 mg/ml einer Menge von 5 ppm Proteine aus der Wirtszelle als unterste nachweisbare Menge. Vorzugsweise enthält damit das erfindungsgemäße Präparat Proteine aus der Wirtszelle in einem Gehalt von 5 ppm bis 100 ppm. Besonders bevorzugt wird eine EPO-Präparation verwendet, bei der auf diese Weise keine Proteine aus der Wirtszelle mehr nachweisbar sind.

Unter "DNA aus der Wirtszelle" ist die Gesamtmenge von DNA dieser Wirtszelle (genomische, ribosomale, mitochondriale etc. DNA) zu verstehen. Dieser Gehalt schließt auch die DNA, welche für EPO codiert und beispielsweise durch Transformation mit einer exogenen DNA erhalten wurde, ein. Er wird zweckmäßig bezogen auf eine üblicherweise verwendete therapeutische Dosis von EPO von 83 µg. Die Bestimmung des Gehalts an DNA der

Wirtszelle erfolgt durch einen Hybridisierungstest mit radioaktiver oder Fluoreszenzdedektion. Als Sonden-DNA wird die Gesamt-DNA aus der Wirtszelle verwendet. Diese Gesamt-DNA wird als Standard in diesem Test verwendet. Die untere Nachweisgrenze eines solchen Hybridisierungstests liegt bei etwa 1 pg DNA/83 µg EPO. Vorzugsweise enthält damit das erfindungsgemäße Präparat DNA aus der Wirtszelle in einem Gehalt von 1 - 10 pg oder besonders bevorzugt weniger als 5 pg pro 83 µg EPO. Ganz besonders bevorzugt ist in dem Präparat auf diese Weise keine DNA mehr nachweisbar (≤ 1 pg DNA).

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Proteinpräparats mit humaner Erythropoietinaktivität, welches gekennzeichnet ist durch:

- a) einen Gehalt von Proteinen, die aus der Wirtszelle stammen, von höchstens 100 ppm (w/w), vorzugsweise 40 ppm oder weniger, und besonders bevorzugt 20 ppm oder weniger,
- b) einen Gehalt von DNA aus der Wirtszelle von höchstens 10 pg pro 83 µg EPO, vorzugsweise 1 pg pro 83 µg EPO oder weniger, und dadurch, daß
- c) das Präparat vollständig frei von natürlichen Säugerproteinen ist, die nicht aus der Wirtszelle stammen,

durch Expression einer für EPO codierenden DNA in einer eukaryontischen Wirtszelle, Kultivierung der Wirtszelle in einem Medium, frei von natürlichen Säugerproteinen, chromatographische Reinigung von EPO aus dem Zellüberstand durch Farbstoffaffinitätschromatographie, Chromatographie an Hydroxyapatit, reversed phase Chromatographie und Anionenaustauschchromatographie, dadurch gekennzeichnet, daß nach der Farbstoffaffinitätschromatographie eine hydrophobe Chromatographie an einem butylierten Träger erfolgt.

Überraschenderweise hat sich gezeigt, daß mit diesen Verfahren EPO vorzugsweise aus serumfreier Kultur in hoher Reinheit mit einer hohen Ausbeute erhalten werden kann. So wird gegenüber dem Verfahren, welches bei Nobuo, I., et al., J. Biochem. 107 (1990) 352-359 beschrieben ist, in einem kompetitiven ELISA-Test auf EPO eine um ca. den Faktor 2 gesteigerte Ausbeute (25% gegenüber ca. 13% bei Nobuo et al.) erhalten.

Der zum EPO-Nachweis verwendete kompetitive ELISA-Test wurde mit den Schritten: Beschichtung einer Mikrotiterplatte mit einem polyklonalen Antikörper, welcher gegen Maus Fc γ gerichtet ist; Reaktion mit einem monoklonalen Antikörper gegen EPO aus Maus;

Kompetition zwischen EPO-Probe und Peroxidase-markiertem EPO; Substratreaktion mit ABTS® (2,2'-Acino-di-e(3-)ethylbenzthiazolinsulfonat(6)) durchgeführt.

Vorzugsweise wird das Proteinpräparat in Chargen von 0,1 - 10 g hergestellt. Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß eine für therapeutische Einsatzzwecke ausreichende Reinigung von EPO nach Kultur in einem Medium, welches frei von natürlichen Säugerproteinen ist, nur dann erreicht werden kann, wenn nach der Affinitätschromatographie an einem Farbstoff als zweiter Schritt eine hydrophobe Chromatographie erfolgt. Ein Zusatz von Proteasehemmern (z.B. CuSO₄) vor der chromatographischen Reinigung wie von Nobuo, I., et al., J. Biochem. 107 (1990) 352-359 oder in der WO 86/07494 beschrieben ist überraschenderweise nicht erforderlich. Vorzugsweise erfolgt die hydrophobe Chromatographie an einem alkylierten (C₄-C₁₈) oder arylierten (vorzugsweise phenylierten oder benzylierten) Träger. Besonders bevorzugt wird ein butylierter Träger verwendet. In diesem Fall sind Ausbeute des Reinigungsverfahrens und Reinheit des Proteins besonders hoch.

Die Expression einer für EPO-codierenden DNA in einer eukaryontischen Wirtszelle kann beispielsweise durch Transfektion einer geeigneten Wirtszelle, vorzugsweise CHO-Zellen, mit einer exogenen DNA, welche für EPO codiert, durchgeführt werden. Ebenso möglich ist es, eine in der Zelle (beispielsweise humane Nierenzellen) inaktives, endogenes EPO-Gen zu aktivieren, beispielsweise durch ein Verfahren der homologen Rekombination (WO 91/09955 und WO 93/09222). Die Kultivierung der ein aktives EPO-Gen enthaltenden Wirtszellen erfolgt in einer dem Fachmann bekannten Weise in einer Kultur, welcher keine Säugerproteine aus natürlichen Quellen zugesetzt werden. Bei dieser Kultur werden jedoch üblicherweise rekombinant hergestellte (vorzugsweise in Prokaryonten, wie E.coli) Insuline, Albumine und Transferrine zugesetzt.

Ein serumfreies Medium, welches im Rahmen der Erfindung geeignet ist, enthält beispielsweise als Medium DMEM/F12 (z. B. GRH Biosciences/Hazleton Biologics, Denver, US, Best.Nr. 57 - 736), sowie zusätzlich Natriumhydrogencarbonat, L+Glutamin, D+Glucose, rekombinantes Insulin, Natriumselenit, Diaminobutan, Hydrocortison, Eisen(II)Sulfat, Aspargin, Asparginsäure, Serin und einen Stabilisator für Säugerzellen, wie z.B. Polyvinylalkohol, Methylcellulose, Polydextran, Polyethylenglycol, Pluronic F68, Plasmaexpander Polygelin (HEMACCEL) oder Polyvinylpyrrolithion.

Ein wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Reinigung von EPO ist, daß es mit diesem Verfahren gelingt, EPO, welches nach serumfreier Kulturführung einen der

obengenannten Stabilisatoren enthält, in hoher Ausbeute zu reinigen und den oder die Stabilisatoren soweit abzureichern, daß sie nicht mehr nachweisbar sind.

Zur Herstellung von EPO wird die das EPO-Gen enthaltende Wirtszelle durch Passagierung in kleinvolumigen Kulturen an das Medium, das keine Säugerproteine aus natürlichen Quellen enthält, adaptiert. Die adaptierten Zellen werden ggf. kryokonserviert, nach Bedarf der Zellbank entnommen und in serumfreies Medium expandiert.

Zur Aufreinigung wird vorzugsweise der zellfreie Kulturüberstand der Wirtszelle gewonnen und nach Filtration dem erfindungsgemäßen Reinigungsverfahren unterworfen.

Vor Durchführung des Reinigungsverfahrens kann, falls erforderlich, noch eine Filtration zur Abtrennung von Trübungen und/oder eine Konzentrierung durchgeführt werden.

Mit der Farbstoffchromatographie werden im ersten Schritt im wesentlichen Kontaminationen durch Proteasen beseitigt. Vorzugsweise wird als Farbstoff ein blauer Triazinfarbstoff, wie Cibachron® blau, verwendet. Ebenso geeignet sind andere Triazin-Farbstoffe. Das Trägermaterial für die Farbstoffchromatographie ist an sich unkritisch, vorzugsweise wird jedoch ein Trägermaterial auf Polysaccharidbasis, wie z. B. Sepharose, vorzugsweise Sepharose 6 fast flow, verwendet. Die Äquilibration der Säule erfolgt mit Puffer, pH 4,5 - 5,5, vorzugsweise 4,8 - 5,2, vorzugsweise mit Acetatpuffer oder Essigsäure. Vorzugsweise wird bei Temperaturen von 1-10°C, besonders bevorzugt bei ca. 5°C gearbeitet.

Die Elution kann durch Erhöhung der Salzkonzentration bei saurem oder neutralem pH-Wert (vorzugsweise pH 5 - 7) erfolgen. Bei basischem pH-Wert, vorzugsweise pH 8,5 - 9,5, besonders bevorzugt bei pH 8,8 - 9,2 kann die Elution auch ohne wesentliche Änderung der Salzkonzentration erfolgen.

Wesentlich für die Qualität der Reinigung ist es, daß im zweiten Schritt eine Chromatographie an einem hydrophobisierten Träger durchgeführt wird. Geeignete Adsorbermaterialien für die hydrophobe Chromatographie sind beispielsweise in Protein Purification Methods, A practical approach, Ed. Harris, E.L.V. and Angal S., IRL Press, Oxford, England (1989), S. 224 und Protein Purification, Ed. Janson, J.C., Ryden L, VCH-Verlag, Weinheim, Deutschland (1989), S. 207-226 beschrieben. Das Trägermaterial selbst ist unkritisch und kann beispielsweise Sepharose, ein Copolymerisat aus Acrylsäure und Methacrylsäure oder Kieselgel sein. Wesentlich ist, daß an diesen Träger kovalent hydrophobe Gruppen, vorzugsweise Butylgrup-

pen, gebunden sind. Geeignete Träger sind kommerziell erhältlich (z. B. Butyl-Toyopearl von Toso Haas, Deutschland oder Butylsepharose von Pharmacia, Deutschland).

Besonders bevorzugt wird ein butylierter Träger verwendet. Andere alkylierte oder arylierte Träger binden EPO entweder teilweise irreversibel oder führen zu einer schlechteren Auftrennung.

Die Elution in der hydrophoben Chromatographie erfolgt vorzugsweise durch Erniedrigung der Salzkonzentration (z. B. mit einem Gradienten von 4 mol/l bis 0 mol/l oder durch Zusatz von chaotropen Agentien, wie Jodid, Perchlorat oder Rhodanid oder durch Zusatz von Alkoholen, wie Glycerin, Ethylenglykol oder Isopropanol.

Die Durchführung der hydrophoben Chromatographie erfolgt besonders bevorzugt bei neutralem pH-Wert und in Gegenwart von Salz, vorzugsweise NaCl, ca. 0,75 mol/l. Es ist ebenfalls besonders bevorzugt, die hydrophobe Chromatographie, vorzugsweise in Gegenwart eines niedermolekularen Alkohols, besonders bevorzugt in Gegenwart von Isopropanol durchzuführen. Die Konzentration des Alkohols im Elutionspuffer ist vorzugsweise etwa doppelt bis dreimal so hoch wie im Äquilibrierungspuffer, im Waschpuffer etwa doppelt so hoch wie im Äquilibrierungspuffer. Zur Äquilibrierung (Beladung des Chromatographiematerials) werden bevorzugt etwa 10 - 15 %, vorzugsweise etwa 10 % Isopropanol, bei der Elution etwa 25 % bis 35 %, vorzugsweise etwa 27 % Isopropanol und im Waschpuffer 19 % Isopropanol zugesetzt (Konzentrationsangaben auch für andere Alkohole geeignet, Angabe in Volumen%, v/v).

Die hydrophobe Chromatographie kann in einem weiten Temperaturbereich von ca. 10 - 40°C durchgeführt werden. Vorzugsweise wird jedoch bei kontrollierter Temperatur und $27 \pm 2^\circ\text{C}$ gearbeitet. Temperaturen unter 10°C sind wenig geeignet.

Als weiterer Reinigungsschritt, im erfindungsgemäßen Verfahren, wird eine Trennung an Hydroxyapatit durchgeführt. Zweckmäßig besteht das Säulenmaterial aus Hydroxyapatit, welcher in ein Agarosegerüst eingelagert wird. EPO bindet an diese Matrix und wird vorzugsweise bei niedrigen Phosphatkonzentrationen eluiert. Geeignetes Säulenmaterial ist beispielsweise Hydroxyapatit-Ultrogel (Biosepra, Deutschland) oder HA-Biogel HT (Biorad, Deutschland).

Die Durchführung der Chromatographie erfolgt zweckmäßig bei etwa neutralem pH-Wert. Der Elutionspuffer enthält Phosphat, vorzugsweise Kaliumphosphat, in einer Konzentration von 1 mmol/l bis 100 mmol/l, vorzugsweise ca. 10 mmol/l.

Als weiterer Schritt zur Reinigung schließt sich eine reversed phase Chromatographie an einem hydrophobisierten Träger an. Dies ist vorzugsweise der Träger, der auch für die hydrophobe Chromatographie verwendet wird. Als Chromatographiematerialien für die reversed phase Chromatographie sind beispielsweise geeignet: Phenylsepharose und Octylsepharose (Pharmacia, Schweden), Butyl -Toyopearl (Toso Haas, Deutschland) oder Propyl-TSK (Merck, Deutschland). In diesem Verfahrensschritt ist es jedoch auch bevorzugt, Träger, die längere Alkylgruppen (z. B. C₈ oder C₁₈) enthalten, zu verwenden. Die Äquilibration der Säule erfolgt vorzugsweise im pH-Bereich zwischen 2 und 7, vorzugsweise pH 2,5, wobei vorzugsweise wässrige Trifluoressigsäure verwendet wird. Zur Elution wird ein Gradient vom Äquilibrationpuffer zu einer wässrigen Lösung eines polaren organischen Lösungsmittels, wie beispielsweise Acetonitril, verwendet. Nach der Chromatographie wird das Eluat zweckmäßig neutralisiert.

Als nächster Schritt des erfindungsgemäßen Reinigungsverfahrens schließt sich eine Anionenaustauschchromatographie an. Als Säulenmaterial wird hier vorzugsweise DEAE-Sepharose fast flow verwendet. Die Äquilibration erfolgt bei pH 6 - 9, vorzugsweise bei pH 7,5. Gegebenenfalls nach Waschen, vorzugsweise mit einer sauren Lösung (ca. pH 4,5), wird im Neutralen oder leicht Basischen (pH 6 - 9, vorzugsweise um pH 7,5, unter Erhöhung der Ionenstärke, vorzugsweise mit NaCl) eluiert. Als Puffer werden vorzugsweise Phosphatpuffer verwendet.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert:

Beispiel

1. Ausgangsmaterial

EPO wird in CHO-Zellen nach dem batch-Verfahren fermentiert. Der Fermenter wird mit einer Vorkultur angeimpft und nach ca. 5 Tagen der Fermenterinhalt geerntet. Nach der Ernte werden die CHO-Zellen aus der Fermentationsbrühe durch Abzentrifugieren entfernt. Der zellfreie Kulturüberstand wird mit 1 mol/l Essigsäure auf pH 5,0 - 5,2 eingestellt und bei 1-9°C filtriert.

Als Kulturmedium wird ein serumfreies Medium verwendet, welches besteht aus dem Basismedium DME(HG) HAM's F-12 modified (R5) (GRH Biosciences/Hazleton Biologics, Denver, USA, Best.Nr. 57 - 736), Natriumhydrogencarbonat, L-(+) Glutamin, D-(+)Glucose, rekombinantem Insulin, Natriumselenit, Diaminobutan, Hydrocortison, EisenII-Sulfat, Aspargin, Asparginsäure, Serin und Polyvinylalkohol.

2. Blaue-Sepharose-Chromatographie

2.1 Trennprinzip

Blaue Sepharose (Pharmacia) besteht aus Sepharosekügelchen, an deren Oberfläche der Farbstoff Cibacron®blau kovalent gebunden ist. EPO bindet bei niedriger Ionenstärke und neutralem bis saurem pH-Werten an diesen Träger. EPO wird durch Erhöhung der Ionenstärke und des pH-Wertes eluiert.

2.2 Durchführung

Die Chromatographiesäule (Amicon P440 x 500, Amicon, GB) wird mit 60 - 80 l Blaue Sepharose gefüllt und mit 0,5 N NaOH regeneriert. Anschließend wird die Säule mit ca. 3 Säulenvolumina (SV) Acetatpuffer äquilibriert. Der zellfreie, auf pH 5 eingestellte Kulturüberstand wird bei einer Temperatur von 10 ± 5 °C und einer Flußrate von 800 - 1400 ml/min auf die Säule aufgezogen. Die Säule wird bei gleicher Flußrate und 5 ± 4 °C mit ca. 1 SV Waschpuffer 1 nachgewaschen. Dann folgen ca. 2 SV Waschpuffer 2. Anschließend wird die Säule mit ca. 3 SV Elutionspuffer eluiert. Der gesamte Proteinpeak wird gesammelt (ca. 30 - 60 l), mit HCl auf pH 6,9 eingestellt und bis zur Weiterverarbeitung bei 5 ± 4 °C gelagert. Bei diesem Chromatographieschritt wird die Produktlösung konzentriert und eine Reinheit von ca. 40 - 50 % erreicht.

Äquilibrierpuffer:	20 mM Na-Acetat, 5 mM CaCl ₂ , 0,1 M NaCl, pH $5,0 \pm 0,2$
Waschpuffer 1:	20 mM Na-Acetat, 5 mM CaCl ₂ , 0,25 M NaCl, pH $5,0 \pm 0,2$
Waschpuffer 2:	20 mM Tris HCl, 5 mM CaCl ₂ , pH $6,5 \pm 0,3$
Elutionspuffer:	100 mM Tris HCl, 5 mM CaCl ₂ , 1 M NaCl, pH $9,0 \pm 0,2$.

3. Butyl-Toyopearl-Chromatographie (hydrophobe Chromatographie)

3.1 Trennprinzip

Butyl-Toyopearl (TosoHaas) ist ein Träger, an dessen Oberfläche Butyl-Reste kovalent gebunden sind. EPO bindet an diese Matrix und wird mit einem Isopropanol-haltigen Puffer eluiert.

3.2 Beladungs- und Elutionsbedingungen

Nach Bindung des Proteins an die Butyl-Matrix in einem Äquilibrierungspuffer, der 10 % Isopropanol enthält, wurde das EPO durch einen Gradienten - bestehend aus wässriger Pufferlösung und 50 %igem Isopropanol- eluiert. Diese Elution beginnt ab ca. 20 % Isopropanol.

Es war zu erwarten, daß der Zusatz des Elutionsmittels Isopropanol im Äquilibrierungspuffer die Bindung von "Fremdprotein" minimiert und die Bindung von EPO schwächt (geringere Kapazität). Überraschenderweise wurde gefunden, daß der Zusatz von Isopropanol im Äquilibrierungspuffer in definierten Konzentrationen (10-15 %), die Bindung von EPO erhöht und dabei auch die Ausbeute verbessert (vergl. Tabelle 1).

EPO bindet bei +4°C nicht an Butyl-Toyopearl. Bei +25°C werden 800µg EPO/ml Adsorber gebunden (durch Isopropanol auf 1.000 µg/ml gesteigert) und bei +35°C überraschenderweise sogar 1.700 µg EPO/ml Butyl-Toyopearl.

Tabelle 1: EPO-Ad- und Desorption in Abhängigkeit vom Isopropanol-Zusatz

% Isopropanol im Äquilibrierungspuffer	0	10	15	17	19
% EPO im Waschpuffer	24	<1	<1	<1	10
% EPO im Eluat	76	96	93	83	69

3.3 Durchführung

Die Chromatographiesäule (Pharmacia BPG 300/500) wird mit 30 - 40 l Butyl-Toyopearl gefüllt und mit 4 M Guanidin-HCl und 0,5 N NaOH regeneriert. Anschließend wird die Säule mit mindestens 3 SV Äquilibrierpuffer äquilibriert.

Das Eluat der Blauen Sepharose-Säule wird auf 10 % Isopropanol eingestellt und bei einer Temperatur von 27 ± 2 °C und einer Flußrate von 800 - 1200 ml/min auf die Säule aufgezogen. Die Säule wird bei gleicher Temperatur und Flußrate mit ca. 1 SV Äquilibrierpuffer und dann mit ca. 2 SV Waschpuffer nachgewaschen. Anschließend wird sie mit ca. 3 SV Elutionspuffer eluiert. Der gesamte Proteinpeak wird gesammelt (ca. 10 - 18 l), sofort mit Verdünnungspuffer um den Faktor 3 verdünnt und bis zur Weiterverarbeitung bei 15°C gelagert. Bei dieser Chromatographie wird eine Reinheit von ca. 90 % erreicht.

Äquilibrierpuffer:	20 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl_2 , 0,75 M NaCl, 10 % Isopropanol, pH $6,9 \pm 0,2$
Waschpuffer:	20 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl_2 , 0,75 M NaCl, 19 % Isopropanol, pH $6,9 \pm 0,2$
Elutionspuffer:	20 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl_2 , 0,75 M NaCl, 27 % Isopropanol, pH $6,9 \pm 0,2$
Verdünnungspuffer:	20 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl_2 , pH $6,9 \pm 0,2$

4. Hydroxyapatit Ultrogel-Chromatographie

4.1 Trennprinzip

Hydroxyapatit Ultrogel (Biosepra) besteht aus Hydroxyapatit (kristallines Kalziumphosphat), das in einem Agarosegerüst eingelagert ist, um seine mechanischen und hydrodynamischen Eigenschaften zu verbessern. EPO bindet an diese Matrix und wird bei einer niedrigeren Phosphatkonzentration als die meisten Proteinverunreinigungen eluiert.

4.2 Durchführung

Die Chromatographiesäule (Amicon P440 x 500 oder Äquivalent) wird mit 30 - 40 l Hydroxyapatit Ultrogel gepackt und mit 0,5 N NaOH regeneriert. Anschließend wird die Säule mit mindestens 4 SV Äquilibrierpuffer äquilibriert.

Das Eluat der Butyl-Toyopearl Säule wird bei einer Temperatur von ca. 15°C und einer Flußrate von 500 - 1200 ml/min auf die Säule aufgezogen. Die Säule wird bei gleicher Temperatur und Flußrate mit ca. 1 SV Äquilibrierpuffer und dann mit ca. 2 SV Waschpuffer nachgewaschen. Anschließend wird sie mit ca. 3 SV Elutionspuffer eluiert. Der gesamte Proteinpeak wird gesammelt (ca. 10 - 18 l) und bis zur Weiterverarbeitung bei 15°C gelagert. Bei dieser Chromatographie wird eine Reinheit von besser 95 % erreicht.

Äquilibratorpuffer: 20 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂, 0,25 M NaCl, 9 % Isopropanol,
pH 6,9 ± 0,2
Waschpuffer: 10 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂, pH 6,8 ± 0,2
Elutionspuffer: 10 mM Tris-HCl, 10 mM K-Phosphat, 0,5 mM CaCl₂,
pH 6,8 ± 0,2

5. Reversed Phase HPLC (RP-HPLC)

5.1 Trennprinzip

Das RP-HPLC-Material z.B. Vydac C4 (Vydac, USA) besteht aus Kieselgelpartikeln, deren Oberfläche C4-Alkylketten trägt. Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen bindet EPO an diese Matrix und wird mit einem Acetonitrilgradienten in verdünnter Trifluoressigsäure selektiv eluiert.

5.2 Durchführung

Die präparative HPLC wird mit einer Merck Prepbar 100 -Trennanlage (oder Äquivalent) bei einer Temperatur von 22 ± 4 °C durchgeführt. Die Trennsäule (100 mm x 400 mm, 3,2 l) ist mit Vydac C4-Material gepackt. Vor dem Einsatz wird die Säule durch mehrfaches Anlegen eines Gradienten von Puffer A nach 100 % Lösungsmittel regeneriert und anschließend mit Puffer A äquilibriert.

Das Eluat der Hydroxyapatit-Säule wird mit Trifluoressigsäure auf ca. pH 2,5 angesäuert und sterilfiltriert. Anschließend wird es bei einer Temperatur von 22 ± 4 °C und einer Flußrate von 250 - 310 ml/min auf die Säule aufgezogen. Die Säule wird bei gleicher Temperatur und Flußrate mit einem linearen Gradient von Puffer A nach Puffer B eluiert. Der Elutionspeak wird in Fraktionen aufgefangen. Durch Vorlegen von 4 Volumina HPLC-Verdünnungspuffer wird das Eluat sofort neutralisiert.

Fraktionen, die bei der analytischen HPLC eine Reinheit von mindestens 99 % aufweisen, werden vereinigt (Poolvolumen ca. 4 - 6 l). Bei dieser Chromatographie werden Spurenverunreinigungen abgetrennt und eine Reinheit von besser 99 % erreicht.

Puffer A: 0,1 % Trifluoressigsäure in Wasser
Puffer B: 80 % Acetonitril, 0,1 % Trifluoressigsäure in Wasser
HPLC-Verdünnungspuffer: 10 mM Na/K-Phosphat, pH 7,5 ± 0,2

6. DEAE-Sepharose ff Chromatographie

6.1 Trennprinzip

DEAE Sepharose fast flow (Pharmacia) besteht aus DEAE-Gruppen, die kovalent an die Oberfläche von Sepharosekügelchen gebunden sind. Aufgrund ionischer Wechselwirkungen bindet EPO an diese Matrix und wird durch Erhöhung der Ionenstärke eluiert.

6.2 Durchführung

Die Chromatographiesäule (Amicon P90 x 250 oder Äquivalent) wird mit 100 - 200 ml Gel pro g EPO im Auftrag gefüllt und mit 0,5 N NaOH regeneriert. Anschließend wird die Säule zunächst mit 100 mM Na/K-Phosphatpuffer, pH 7,5 und dann mit mindestens 12 SV Äquilibratorpuffer äquilibriert.

Das Eluat der HPLC-Säule wird bei einer Temperatur von 5 ± 4 °C und einer Flußrate von ca. 150 ml/min auf die Säule aufgezogen. Die Säule wird bei gleicher Temperatur und Flußrate mit mindestens 5 SV Äquilibratorpuffer und dann mit ca. 10 SV Waschpuffer gewaschen. Anschließend wird sie erneut mit ca. 10 SV Äquilibratorpuffer gewaschen und dann mit ca. 7 SV Elutionspuffer eluiert. Der gesamte Proteinpeak wird gesammelt (ca. 2 - 5 l), sterilfiltriert und abgefüllt.

Bei dieser Chromatographie wird das Lösungsmittel aus dem HPLC-Schritt abgetrennt und Spurenverunreinigungen entfernt. Die Reinheit ist besser 99 %.

Äquilibratorpuffer:	10 mM Na/K-Phosphat, pH $7,5 \pm 0,2$
Waschpuffer:	30 mM Na-Acetat, pH $4,5 \pm 0,1$
Elutionspuffer:	10 mM Na/K-Phosphat, 80 mM NaCl pH $7,5 \pm 0,2$

Referenzliste

Bavister, B., J. Expcology 217 (1981) 45-51

EP-A 0 248 656

EP-A 0 267 678

EP-A 0 307 247

EP-A 0 343 635

EP-A 0 481 791

EP-A 0 513 738

EP-B 0 148 605

- EP-B 0 205 564
EP-B 0 209 539
EP-B 0 411 678
Huang, S.L., PNAS, USA 81 (1984) 2708-2712
Kawamoto, T. et al., Analytical Biochem. 130 (1983) 445-453
Kowar, J. und Franek, F., Methods in Enzymology 421 (1986) 277-292
Lai, P.H. et al., J. Biol. Chem. 261 (1986) 3116-3121
Nobuo, I., et al., J. Biochem. 107 (1990) 352-359
Protein Purification Methods, A practical approach, Ed. Harris, E.L.V., and Angal S., IRL Press, Oxford, England (1989) Seite 224
Protein Purification, Ed. Janson, J.C., Ryden, L., VCH-Verlag, Weinheim, Deutschland (1989), Seiten 207-226.
Sasaki, H. et al., J. Biol. Chem 262 (1987) 12059-12076
WO 86/07494
WO 88/00967
WO 91/09955
WO 93/09222

Patentansprüche

1. Therapeutisch wirksames Präparat eines Proteins mit Erythropoietinaktivität, erhältlich nach Kultivierung einer Wirtszelle, welche Erythropoietin produziert, gekennzeichnet durch
 - a) einen Gehalt von Proteinen, die aus der Wirtszelle stammen, von ≤ 100 ppm
 - b) einen Gehalt von DNA aus der Wirtszelle von ≤ 10 pg/83 μ g Erythropoietinund dadurch, daß
 - c) das Präparat vollständig frei von natürlichen Säugerproteinen ist, die nicht aus der Wirtszelle stammen.
2. Verfahren zur Herstellung eines Proteinpräparats mit Erythropoietinaktivität, welches gekennzeichnet ist durch
 - a) einen Gehalt von Proteinen, die aus der Wirtszelle stammen, von ≤ 100 ppm
 - b) einen Gehalt von DNA aus der Wirtszelle von ≤ 10 pg/83 μ g Erythropoietinund dadurch, daß
 - c) das Präparat vollständig frei von natürlichen Säugerproteinen ist, die nicht aus der Wirtszelle stammen,durch Expression einer für das Protein codierenden DNA in einer eukaryontischen Wirtszelle, Kultivierung der Wirtszelle in einem Medium, frei von natürlichen Säugerproteinen, chromatographische Reinigung des Proteins aus dem Zellüberstand durch Farbstoffaffinitätschromatographie, Chromatographie an Hydroxyapatit, reversed phase Chromatographie und Aniontauschchromatographie, dadurch gekennzeichnet, daß nach der Farbstoffaffinitätschromatographie eine hydrophobe Chromatographie erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die hydrophobe Chromatographie an einem butylierten Träger erfolgt.

4. Verfahren nach den Ansprüchen 2 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die reversed phase Chromatographie an einem butylierten Träger bei neutralem pH-Wert erfolgt.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Beladung und/oder Elution der hydrophoben Chromatographie in Gegenwart eines Alkohols erfolgt.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß zur Elution Isopropanol in einer Menge von 25 - 35 % (v/v) verwendet wird.
7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß zur Beladung Isopropanol in einer Menge von 10 - 15 % (v/v) verwendet wird.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In tional Application No
PCT/EP 96/01988

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07K14/505 A61K38/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 107, no. 3, 1990, TOKYO JP, pages 352-359, XP002013005 IMAI NOBUO: "Physicochemical and biological comparison of recombinant human erythropoietin with human urinary erythropoietin" see the whole document ---	1
X	EP,A,0 267 678 (INTEGRATED GENETICS) 1988 cited in the application see page 6 - page 9 ---	1
X	EP,A,0 358 463 (BIOCLONES LIMITED) 1990 see examples 1,2 ---	1
A	WO,A,86 07594 (KIRIN-AMGEN INC) 1986 see page 7 - page 10; claim 26 ---	1-7
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 September 1996

Date of mailing of the international search report

20.09.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fernandez y Branas, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In tional Application No

PCT/EP 96/01988

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, vol. 15, no. 2, 1987, LAWRENCE, pages 171-176, XP002013006 CHOPPIN, J. ET AL: "Biochemical analyses of murine erythropoietin from plasma and from cloned erythroleukemia cells" see the whole document ---	2
A	WO,A,86 04068 (GENETICS INSTITUTE) 1986 see the whole document ---	1-7
A	EP,A,0 513 738 (BOEHRINGER MANHEIM GMBH) 1992 cited in the application see the whole document ---	1-7
A	WO,A,85 02610 (KIRIN-AMGEN) 1985 see page 61, line 31 - page 65, line 30 ---	1-7
A	NATURE, vol. 313, 1985, LONDON GB, pages 806-810, XP002013007 JACOBS, K. ET AL: "Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin" see table 1 ---	1-7
A	BUNDESVERBAND DER PHARMAZEUTISCHEN INDUSTRIE BV.: "Rote Liste 1993" 1993, EDITIO CANTOR, AULENDORF/WÜRTT XP002013009 *08070 "Erypo 2000/4000/10000" und 08071 "Recormon 1000/2000/5000"* ---	1
A	BLOOD, vol. 67, no. 1, 1986, NEW YORK, pages 71-79, XP002013008 KRYSTAL G. ET AL: "Purification of human erythropoietin to homogeneity by a rapid five step procedure" see the whole document ---	1-7
A	MURRAY P. DEUTSCHER: "Methods in enzymology, Vol 182, Guide to protein purification" 1990, ACADEMIC PRESS INC, NEW YORK XP002013010 see page 339 - page 343 see page 409 - page 417 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 96/01988

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-267678	18-05-88	US-A- 4954437	04-09-90
		AU-A- 7842987	16-03-89
		JP-A- 63185396	30-07-88

EP-A-358463	14-03-90	AU-A- 4104889	15-03-90
		JP-A- 2115196	27-04-90

WO-A-8607594	31-12-86	US-A- 4667016	19-05-87
		AT-T- 120208	15-04-95
		AU-B- 606578	14-02-91
		AU-A- 6123086	13-01-87
		CA-A- 1297635	17-03-92
		CA-A- 1312994	19-01-93
		DE-D- 3650276	27-04-95
		DE-T- 3650276	27-07-95
		EP-A- 0228452	15-07-87
		JP-B- 6098019	07-12-94
		JP-T- 63503352	08-12-88

WO-A-8604068	17-07-86	US-A- 4677195	30-06-87
		AU-B- 584032	11-05-89
		AU-A- 5191186	29-07-86
		DE-A- 3586104	25-06-92
		EP-A- 0209539	28-01-87
		HK-A- 105793	15-10-93
		JP-B- 1038800	16-08-89
		JP-T- 62501701	09-07-87
		SG-A- 93893	25-02-94
		US-A- 5322837	21-06-94

EP-A-513738	19-11-92	DE-A- 4115722	19-11-92
		JP-A- 5252942	05-10-93

WO-A-8502610	20-06-85	US-A- 4703008	27-10-87
		AU-A- 1007495	06-04-95
		AU-B- 657555	16-03-95
		AU-A- 2042192	08-10-92
		AU-B- 600650	23-08-90
		AU-A- 3746785	26-06-85
		AU-A- 5272293	24-03-94

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 96/01988

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-8502610		AU-A- 5750490	04-10-90
		EP-A- 0148605	17-07-85
		HK-A- 20093	19-03-93
		JP-A- 6093000	05-04-94
		JP-B- 7076239	16-08-95
		JP-A- 1055190	02-03-89
		JP-B- 6055136	27-07-94
		JP-A- 3198792	29-08-91
		JP-B- 4035159	10-06-92
		JP-A- 3259098	19-11-91
		JP-B- 2017156	19-04-90
		JP-T- 61501627	07-08-86
		US-A- 5441868	15-08-95
		US-A- 5547933	20-08-96
		FI-B- 93470	30-12-94
		LT-A,B 1836	25-08-95
		LV-B- 10506	20-10-95
		BG-B- 60508	30-06-95
		CN-A- 1065019	07-10-92
		CN-A- 1062764	15-07-92

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/01988

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07K14/505 A61K38/18

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 107, Nr. 3, 1990, TOKYO JP, Seiten 352-359, XP002013005 IMAI NOBUO: "Physicochemical and biological comparison of recombinant human erythropoietin with human urinary erythropoietin" siehe das ganze Dokument ---	1
X	EP,A,0 267 678 (INTEGRATED GENETICS) 1988 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 6 - Seite 9 ---	1
X	EP,A,0 358 463 (BIOCLONES LIMITED) 1990 siehe Beispiele 1,2 ---	1
A	WO,A,86 07594 (KIRIN-AMGEN INC) 1986 siehe Seite 7 - Seite 10; Anspruch 26 ---	1-7
-/-		

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. September 1996

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

20.09.96

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Fernandez y Branas, F

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter. "onales Aktenzeichen

PC1/EP 96/01988

C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, Bd. 15, Nr. 2, 1987, LAWRENCE, Seiten 171-176, XP002013006 CHOPPIN, J. ET AL: "Biochemical analyses of murine erythropoietin from plasma and from cloned erythroleukemia cells" siehe das ganze Dokument ---	2
A	WO,A,86 04068 (GENETICS INSTITUTE) 1986 siehe das ganze Dokument ---	1-7
A	EP,A,0 513 738 (BOEHRINGER MANHEIM GMBH) 1992 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-7
A	WO,A,85 02610 (KIRIN-AMGEN) 1985 siehe Seite 61, Zeile 31 - Seite 65, Zeile 30 ---	1-7
A	NATURE, Bd. 313, 1985, LONDON GB, Seiten 806-810, XP002013007 JACOBS, K. ET AL: "Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin" siehe Tabelle 1 ---	1-7
A	BUNDESVERBAND DER PHARMAZEUTISCHEN INDUSTRIE BV.: "Rote Liste 1993" 1993, EDITIO CANTOR, AULENDORF/WÜRTT XP002013009 *08070 "Erypo 2000/4000/10000" und 08071 "Recormon 1000/2000/5000"* ---	1
A	BLOOD, Bd. 67, Nr. 1, 1986, NEW YORK, Seiten 71-79, XP002013008 KRYSTAL G. ET AL: "Purification of human erythropoietin to homogeneity by a rapid five step procedure" siehe das ganze Dokument ---	1-7
A	MURRAY P. DEUTSCHER: "Methods in enzymology, Vol 182, Guide to protein purification" 1990, ACADEMIC PRESS INC, NEW YORK XP002013010 siehe Seite 339 - Seite 343 siehe Seite 409 - Seite 417 -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/01988

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-267678	18-05-88	US-A- 4954437	04-09-90
		AU-A- 7842987	16-03-89
		JP-A- 63185396	30-07-88

EP-A-358463	14-03-90	AU-A- 4104889	15-03-90
		JP-A- 2115196	27-04-90

WO-A-8607594	31-12-86	US-A- 4667016	19-05-87
		AT-T- 120208	15-04-95
		AU-B- 606578	14-02-91
		AU-A- 6123086	13-01-87
		CA-A- 1297635	17-03-92
		CA-A- 1312994	19-01-93
		DE-D- 3650276	27-04-95
		DE-T- 3650276	27-07-95
		EP-A- 0228452	15-07-87
		JP-B- 6098019	07-12-94
		JP-T- 63503352	08-12-88

WO-A-8604068	17-07-86	US-A- 4677195	30-06-87
		AU-B- 584032	11-05-89
		AU-A- 5191186	29-07-86
		DE-A- 3586104	25-06-92
		EP-A- 0209539	28-01-87
		HK-A- 105793	15-10-93
		JP-B- 1038800	16-08-89
		JP-T- 62501701	09-07-87
		SG-A- 93893	25-02-94
		US-A- 5322837	21-06-94

EP-A-513738	19-11-92	DE-A- 4115722	19-11-92
		JP-A- 5252942	05-10-93

WO-A-8502610	20-06-85	US-A- 4703008	27-10-87
		AU-A- 1007495	06-04-95
		AU-B- 657555	16-03-95
		AU-A- 2042192	08-10-92
		AU-B- 600650	23-08-90
		AU-A- 3746785	26-06-85
		AU-A- 5272293	24-03-94

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/01988

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-8502610		AU-A- 5750490	04-10-90
		EP-A- 0148605	17-07-85
		HK-A- 20093	19-03-93
		JP-A- 6093000	05-04-94
		JP-B- 7076239	16-08-95
		JP-A- 1055190	02-03-89
		JP-B- 6055136	27-07-94
		JP-A- 3198792	29-08-91
		JP-B- 4035159	10-06-92
		JP-A- 3259098	19-11-91
		JP-B- 2017156	19-04-90
		JP-T- 61501627	07-08-86
		US-A- 5441868	15-08-95
		US-A- 5547933	20-08-96
		FI-B- 93470	30-12-94
		LT-A,B 1836	25-08-95
		LV-B- 10506	20-10-95
		BG-B- 60508	30-06-95
		CN-A- 1065019	07-10-92
		CN-A- 1062764	15-07-92
